

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25560414

研究課題名(和文)ミトコンドリアオートファジー関連薬物の探索

研究課題名(英文)Screen the chemicals that efficiently induce mitophagy

研究代表者

神吉 智丈 (KANKI, Tomotake)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：50398088

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：最近の研究から、オートファジーがミトコンドリアを選択的に分解することが知られるようになり、ミトコンドリアオートファジー(マイトファジー)と呼ばれている。マイトファジーは、ほとんどの真核生物に認められるミトコンドリア分解機構であり、最近の研究から、特に機能低下に陥ったミトコンドリアを選択的に分解している、即ち、マイトファジーはミトコンドリア恒常性維持に重要であると考えられるようになってきた。本研究では、マイトファジーを誘導する薬物を同定し、疾患治療への応用を検討することを目的として研究を行い、数種類のマイトファジー誘導薬物候補を同定した。

研究成果の概要(英文)：Mitophagy is a process that degrades cytoplasmic proteins and organelles. Recent studies revealed that autophagy selectively degrade mitochondria and this process is called mitochondria autophagy or mitophagy. Mitophagy is conserved within almost all eukaryote. Recently, it is known that mitophagy selectively degrade damaged or dysfunctional mitochondria, in another word, mitophagy contribute to maintain cellular mitochondrial homeostasis. In this study, we aim to identify the chemicals that efficiently induce mitophagy and applied the chemicals for clinical use. We identified several candidate chemicals which can induce mitophagy.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ミトコンドリア オートファジー

1. 研究開始当初の背景

(1) オートファジーは、細胞内のタンパク質やオルガネラを分解する機構であり、オートファジーによってミトコンドリアも分解されていることは以前から知られていた。しかし、オートファジーが他のタンパク質やオルガネラと区別してミトコンドリアを選択的に分解していることが知られるようになったのは最近のことである。このオートファジーによるミトコンドリアの選択的な分解機構はマイトファジー (mitophagy; mitochondria autophagy の略) と呼ばれている。

(2) 2007 年以降、国内外でマイトファジーの研究が盛んに行われるようになり、主として3つの研究グループが本領域を平行して発展させてきた。一つは米国 NIH の Youle らのパーキンソン病とマイトファジーの関係に関する研究 (Narendra D. et al. JCB 2008 等)、二つ目は米国 St. Jude 小児病院の Ney らのマイトファジーによる赤芽球からのミトコンドリア除去の研究 (Schweers RL. et al. PNAS 2007 等)、三つ目は大阪大学の岡本らや本研究代表者らが中心となって行っている出芽酵母におけるマイトファジーの制御と分子機構の研究 (Kanki T. et al. JBC 2008、Okamoto K. et al. Dev. Cell 2009、Kanki T. et al. Dev. Cell 2009、Kanki T. et al. MBC 2009 等) である。こうした研究の結果、マイトファジーは非常に効率的かつ選択的に機能低下した、もしくは余剰に存在するミトコンドリアを分解し、ミトコンドリアの品質を管理していることが明らかになった。

(3) 上述のように、マイトファジーは種々の病態にも関連し、ミトコンドリアの品質管理に重要な役割を担っているにもかかわらず、未だに解明されていない点が多い。生命現象の研究において、その現象を特異的に誘導/抑制できる薬剤の存在は、その研究を進展させる意味で非常に重要である。

2. 研究の目的

本研究は、研究代表者らがこれまでに確立してきたマイトファジーの簡便な検出法 (Kanki T. et al. JBC 2008、Kanki T. et al. Autophagy 2009) や、新たに作成したヒト培養細胞でのマイトファジー観察法を用いて、マイトファジーを特異的に誘導/抑制できる薬物を同定することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) マイトファジーは、ミトコンドリアをオートファゴソームと呼ばれる脂質二重膜が選択的に包み込んだ後、リソソームに運んで分解する現象である。リソソームは、細胞内で唯一の酸性小器官であり、pH をモニタ

ーできるレポーターを使用することで、ミトコンドリアのリソソームへの輸送を検出することができる。

(2) 原理・方法: pH 感受性蛍光タンパク質 Keima は、細胞質やミトコンドリア内のような中性環境では 440nm の光で励起されるが、リソソームに取り込まれ酸性環境になると 590nm で励起されるようになる (Katayama et al. Chem Biol 2011)。ミトコンドリア移行シグナルを付けた mt-Keima をヒト培養細胞に発現させた場合、mt-Keima はミトコンドリアに局在し、440nm 励起時のみでミトコンドリア特有のチューブ状の像を示す (図 1 左上)。低酸素刺激によりマイトファジーが誘導され、ミトコンドリアが酸性オルガネラであるリソソームに取り込まれると、それらが 590nm で励起されるリソソーム内のドットとして観察されるようになる (図 1 右下)。申請者らは、テトラサイクリン誘導性 mt-Keima 発現細胞 (HeLa、SH-SY5Y、A549 株) を樹立し、感度良くマイトファジーを観察することに成功している (Hirota et al. Autophagy 2015) (下図 1)。

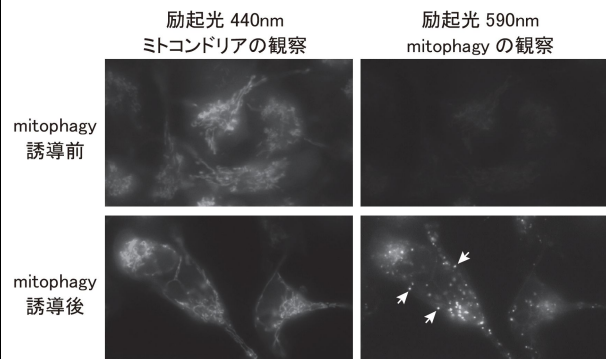


図 1: ヒト細胞 (HeLa) での mitophagy 観察法
矢印で示す様なドットがすべて mitophagy の結果である

(3) 簡便性、定量性: mt-Keima 細胞では、生きたままの細胞でマイトファジーが検出できるため、マイトファジー誘導刺激の 12 ~ 24 時間後にそのまま蛍光顕微鏡で観察することができる。下図右下のように、マイトファジーは鮮明なドットとして示され、マイトファジーが起きていることは、目視で瞬時に判定できる。本研究で使用する顕微鏡カメラ画像では 3 ~ 5 ピクセルのドットで示され、コンピューターによるドット数の定量も容易で、再現性が高く、目視と併用することでマイトファジー誘導が確実に定量的に判定できる。

(4) 96well プレートで培養した mt-Keima 細胞に薬物を作用させ 24 時間後に GE 社ハイスループット顕微鏡 IN Cell Analyzer (対物 40 倍) で 590nm 励起画像を取得し、ドット数を定量する。

4. 研究成果

(1) 予備実験等により、出芽酵母を用いたマイトファジー観察よりもヒト培養細胞を用いたマイトファジー観察の方が、細胞のサイズが大きいことなどから効率的であると判断した。

(2) マイトファジー誘導薬物のスクリーニング：約1400種類の化合物を mt-Keima 細胞に作用させ、マイトファジー観察、定量した結果、7種類の薬物において、すでにマイトファジー誘導効果があることが報告されている DFP がよりもマイトファジーが強く誘導された(図2にスクリーニングの一部を示す)。

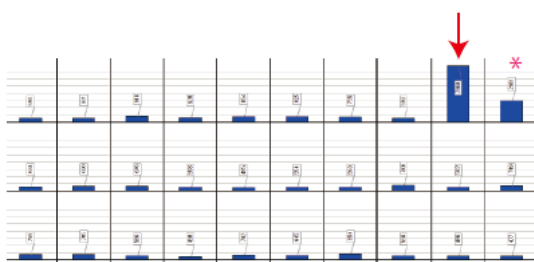


図2：マイトファジー誘導薬物のスクリーニングの一部

96well プレート上で培養した細胞に種々の薬物を投与しマイトファジー誘導により生じるドット数を計測した。*は最近報告されたマイトファジー誘導能のある DFP (ポジティブコントロール)。矢印が新規に同定したマイトファジー誘導薬物の一つ。



図3：マイトファジー誘導薬物のスクリーニングの一部

96well プレート上で培養した細胞に種々の薬物を投与し様々な薬物を投与し低酸素しげきによりマイトファジー誘導し、生じるドット数を計測した。矢印が新規に同定したマイトファジー阻害薬の一つ。

(3) マイトファジー阻害剤のスクリーニング：約1400種類の化合物を mt-Keima 細胞に作用させ、低酸素培養にてマイトファジーを誘導し、マイトファジーを観察、定量した。5種類の薬物においてマイトファジーが

効率的に抑制されていた。(図3にスクリーニングの一部を示す)

(4) 現在、同定したマイトファジー誘導、阻害薬物候補を現在さらに解析中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5件)

Hirota Y, Yamashita SI, Kurihara Y, Jin X, Aihara M, Saigusa T, Kang D, Kanki T Mitophagy is primarily due to alternative autophagy and requires MAPK1 and MAPK14 signaling pathways Autophagy. 2015;11(2):332-43. 査読有り doi: 10.1080/15548627.2015.1023047.

Kanki T, Furukawa K, Yamashita SI. Mitophagy in yeast: Molecular mechanisms and physiological role. Biochim Biophys Acta. 2015 in press 査読有り doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.01.005.

Aihara M, Jin X, Kurihara Y, Yoshida Y, Matsushima Y, Oku M, Hirota Y, Saigusa T, Aoki Y, Uchiumi T, Yamamoto T, Sakai Y, Kang D, Kanki T. Tor and the Sin3-Rpd3 complex regulate expression of the mitophagy receptor protein Atg32 in yeast. J Cell Sci. 2014;127:3184-96. 査読有り doi: 10.1007/978-1-4939-0799-1_11.

Kanki T, Okamoto K. Assays for Autophagy II: Mitochondrial Autophagy. Methods Mol Biol. 2014;1163:165-73. 査読有り doi: 10.1007/978-1-4939-0799-1_11.

Kanki T, Kurihara Y, Jin X, Goda T, Ono Y, Aihara M, Hirota Y, Saigusa T, Aoki Y, Uchiumi T, Kang D. Casein kinase 2 is essential for mitophagy. EMBO Rep. 2013; 14(9): 788-94 査読有り doi: 10.1038/embor.2013.114.

[学会発表](計 2件)

Tomotake Kanki The signaling pathways regulating mitophagy in yeast 2nd International Symposium on Protein Modification in Pathogenic Dysfunction of Signaling 東京大学医科学研究所(東京都、港区) 2015.1.23 ~ 2015.1.24

Tomotake Kanki

Signaling pathways regulating mitophagy
in yeast

2014 Northeastern Asian Symposium on
Autophagy (招待) 釜山 (韓国)

2014.12.18 ~ 2014.12.21

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.niigata-u.ac.jp/mit/>

http://www.niigata-u.ac.jp/tenure_track/researcher/kanki_tomotake.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神吉 智丈 (KANKI, Tomotake)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：50398088

(2) 研究分担者

山下 智大 (YAMASHITA, Tomohiro)

九州大学・薬学研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：30645635

(3) 連携研究者

山下 俊一 (YAMASHITA, Shun-ichi)

新潟大学・医歯学系・特任助教

研究者番号：30529095